第 27 卷 第 3 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 27, No. 3
1984 年 8 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Aug., 1984

柞蚕卵巢中核酸和蛋白质的分布与含量的变化

伊淑霞　　郭　郛
（中国科学院动物研究所）

摘要　本文报道柞蚕卵巢亚细胞组分中核酸和蛋白质的分布与含量变化。首先以差速离心的方法从卵巢匀浆中分离出细胞核、重线粒体、轻线粒体、重微粒体、轻微粒体和 105,000g 上清六个组分，然后分别测定了各种组分中的 DNA、RNA 和蛋白质的含量。

结果表明，卵巢 DNA 主要分布在细胞核组分中(约占 75% 以上)；RNA 在微粒体中含量较高(约占 20—51%)；蛋白质则主要分布于 105,000g 上清组分中(约占 56—83%)。卵巢中核酸和蛋白质含量(毫克/头)在滞育蛹期很低，随着卵巢的发育而迅速增长。DNA 在发育蛹 4 期最高，比滞育蛹期增长 61 倍；RNA 在发育蛹 5 期最高，比滞育蛹期增长 144 倍；蛋白质在成虫期达到高峰，约比滞育蛹期增长 490 倍。并讨论了核酸和蛋白质的含量变化与卵巢细胞分裂分化之间的关系。

为了获得进一步的生化资料，对不同时期的柞蚕卵巢105,000g 上清组分中的蛋白质进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳和 SDS-电泳的分析。初步推测柞蚕卵巢中卵黄蛋白亚基之一的分子量大约为 200,000 道尔顿。

关键词　柞蚕　卵巢　核酸　蛋白质

柞蚕 *Antheraea pernyi* 是一种宝贵的经济昆虫。柞蚕的饲养和丝绸的生产，起源于我国的山东半岛，已具有悠久的历史，至今，柞蚕丝绸仍然是我国的特产之一。因此，开展对柞蚕的生化研究，在我国有其特殊的经济意义。

柞蚕生活史中最明显的两个特点是：蛹期滞育和生殖腺在蛹期基本发育成熟。柞蚕蛹期滞育的现象早已引起了国内外许多学者的注意，日本的田中(1937, 1950, 1951)和美国的 Williams (1963, 1964, 1965, 1967, 1969) 等人在这方面进行了详细的研究，肯定了光周期是影响柞蚕滞育的重要因素，发现光周期不仅决定柞蚕蛹滞育的开始，也决定滞育的解除。一些早期的研究结果表明，对柞蚕滞育的临界光照时间 (14 小时 10 分钟)、引起光照反应的光波段 (395—500nm)和温度对光照反应的影响等生态问题已基本搞清；对感受光照的发育周期、光照的感受器官(脑神经分泌细胞)和感受光照调节发育程序(脑→前胸腺)等生理学问题都已有所了解(王高顺等，1982)。但是，关于柞蚕的生化研究，特别是柞蚕滞育和生殖的生化研究还是一个有待于开拓的领域。鉴于柞蚕本身的生活特点和在我国的特殊地位，以及核酸和蛋白质在细胞中的重要作用，认为从亚细胞水平上探讨柞蚕卵巢中核酸和蛋白质的分布与含量变化以及卵巢蛋白质的电泳性质将是一个很有意义的课题。

本文于 1983 年 2 月收到。
本文文稿承蒙北京大学张宗炳、李建武、本所冯慧、翟启慧和曹永清诸位先生的指正；在实验中得到生物物理所毕坎华、本所高福鸿、丁友真、夏邦颖和于延芬等几位同志的支持，在此一并致谢。

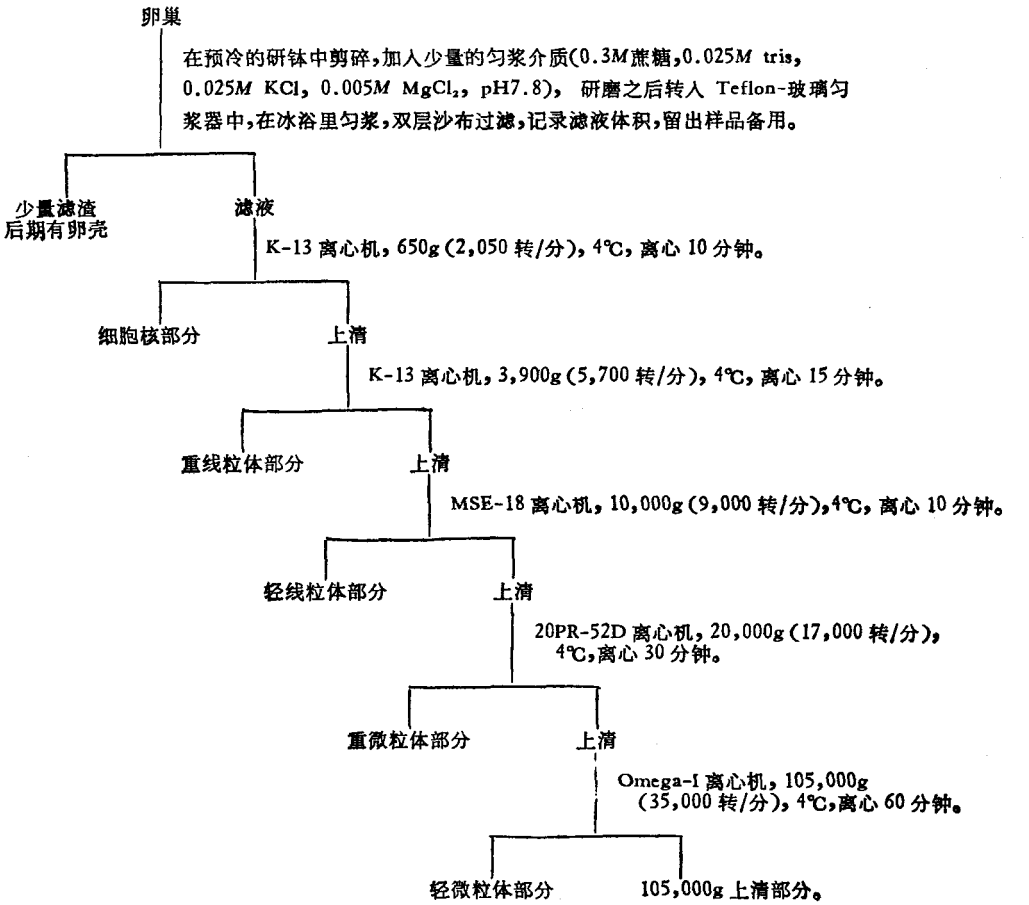
材 料 与 方 法

1. 一化性柞蚕滞育蛹的来源和保存　由河南云阳蚕种场提供，在实验室温度9—17℃和相对湿度 70—75% 的条件下保存。

2. 柞蚕蛹发育时期的划分　根据孙重光等 (1963) 的结果和我们的认真观察，归纳在表 1 中。

3. 取样　按表 1 所列特征，分期取样。取样时先将蛹体表面擦洗干净，沿背中线剪开，迅速取出卵巢，摘除其它组织后，将卵巢放入预冷的称量瓶中，称重。取样数量是，滞育蛹 45 头，发育蛹 1 期 40 头，2 期 30 头，3 期 6 头，4 期 7 头，5 期 4 头，成虫期 3 头。

4. 卵巢匀浆的制备和亚细胞分级　主要采用夏邦颖等(1980)的方法，主要步骤如下：



5. 匀浆和各种亚细胞组分中 DNA、RNA 和蛋白质的分离和提取参照 Shibko (1967) 和夏邦颖等 (1974, 1980) 方法。

6. DNA、RNA 和蛋白质含量的测定　DNA 用二苯胺法测定，以小牛胸腺 DNA 为标准；RNA 用地衣酚法测定，以酵母 RNA 为标准；蛋白质用双缩脲法测定，以牛血清白蛋白为标准。

表 1 柞蚕雌蛹发育情况调查

发育期 \ 部位		头部		腹部		
		颅顶板	复眼	卵巢管	末端卵母细胞直径(mm)	卵巢鲜重(克/头)
滞育蛹		透明	无色透明	透明	—	0.006
发育蛹	1 期	灰玉色透明	无色透明	透明	—	0.013
	2 期	淡乳白色	乳白色	乳白色	1.32	0.034
	3 期	乳白色	橙色	淡苹果绿色	2.89	0.227
	4 期	淡红色	深红色	苹果绿色	4.00	0.577
	5 期	粉红色	紫黑色	卵粒移动，少数卵母细胞有卵壳形成，每克卵巢鲜重含卵壳 0.1 克	4.86	0.985
成虫		紫红色	紫黑色	卵粒排列紧密，绝大多数有卵壳，每克卵巢鲜重含卵壳 0.3 克	5.24	1.857

7. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用莽克强等人(1975)方法。

8. SDS-电泳 采用瑞典 Pharmacia 公司(1978)方法及其提供的高分子量 (HMW) 标准蛋白质系统。

结 果

一、核酸和蛋白质在卵巢亚细胞组分中的分布以及不同时期的含量变化

1. DNA 的分布与含量变化见图 1。从图 1 可以看出，卵巢 DNA 主要分布在细胞核中，大约占卵巢 DNA 的 75% 以上，线粒体组分中也有少量分布，约占卵巢 DNA 的

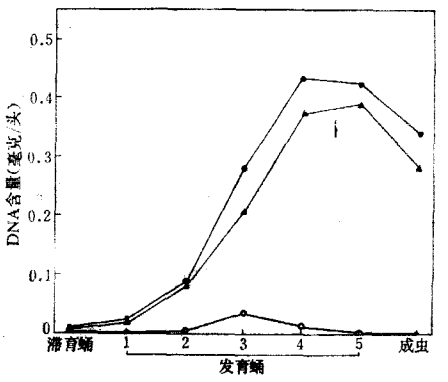


图 1a 柞蚕不同发育期卵巢亚细胞组分中 DNA 的含量(按头计算)

●——●匀浆 ▲——▲细胞核

○——○线粒体

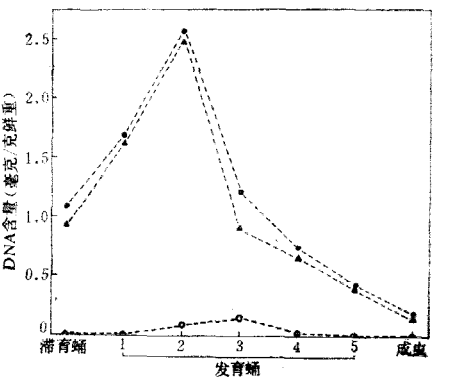


图 1b 柞蚕不同发育期卵巢亚细胞组分中 DNA 的含量(按组织鲜重计算)

●---●匀浆 ▲---▲细胞核

○---○线粒体

12.3% 以下，而微粒体和 105,000g 上清组分中没有发现 DNA 的存在。在卵巢发育过程中，细胞核中和匀浆中的 DNA 含量都发生了明显的变化，二者变化趋势相同。以每头含量计算，滞育期最低，发育 4 期最高，5 期和成虫期有所下降。每克卵巢组织中 DNA 含量以发育 2 期最高，成虫期最低。卵巢细胞核中 DNA 含量的变化，可能反映了滞育期和不同发育时期的柞蚕卵巢中各种细胞的分裂情况和细胞核中 DNA 的复制功能。

2. RNA 的分布与含量变化（图 2 和图 3）卵巢中 RNA 在微粒体组分中含量较高，约占卵巢 RNA 含量的 20—51%；细胞核、线粒体和 105,000g 上清组分中各占卵巢 RNA 含量的 16—23%（细胞核）、8—17%（线粒体）和 13—27%（105,000g 上清组分）。微粒体并不是一种独立的细胞器，它是由内质网膜系统和核糖体颗粒组成的混和组分，核糖体上含有合成蛋白质所需的各种 RNA，这是微粒体组分中 RNA 含量较高的主要原因。

从图 2 和图 3 中可以看到，柞蚕卵巢发育过程中，各种亚细胞组分中 RNA 含量都发生了不同程度的变化，其变化趋势与卵巢匀浆中基本一致。每头柞蚕的卵巢 RNA 含量以滞育期最低，发育 5 期最高，成虫期略有下降。每克卵巢组织中 RNA 的含量以发育 1 期最高，成虫期最低。

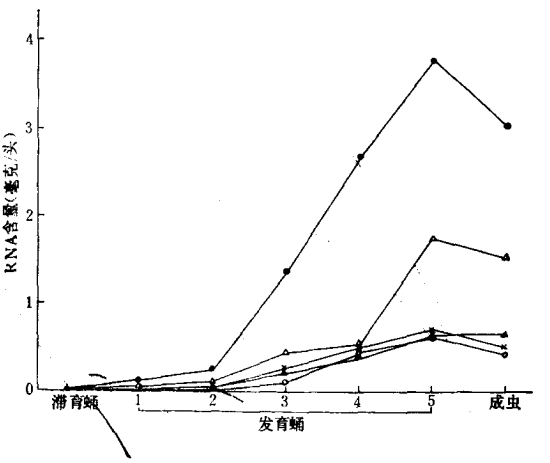


图 2　柞蚕不同发育期卵巢亚细胞组分中 RNA 的含量（按头计算）

●——●匀浆　▲——▲细胞核　○——○线粒体
△——△微粒体　×——×105,000g上清

3. 卵巢 RNA/DNA 比值的变化，见图 4。卵巢 RNA/DNA 比值呈阶段性的变化，即从滞育期到发育 1 期比值急剧上升，发育 1 期至 2 期却迅速下降，从 2 期开始，到 5 期比值再度上升，5 期至成虫期上升不明显。

4. 蛋白质的分布与含量变化见图 5 和图 6。从图 5 和图 6 可知，卵巢蛋白质主要存在于 105,000g 上清组分中，约占卵巢蛋白质含量的 56—83%，细胞核、线粒体和微粒体三个组分中的蛋白质分别占卵巢蛋白质含量的 5.1—23.0%（细胞核）、3.6—10.7%（线粒体）和 4.1—7.3%（微粒体）。卵巢匀浆和各种亚细胞组分中的蛋白质含量都随着卵巢的发育而不断增长，在滞育期，每头含量和每克卵巢鲜重的含量都很低；每头含量在成虫期达到最高水平；而每克卵巢鲜重的含量则在发育 4 期最高，5 期和成虫期逐渐下降。

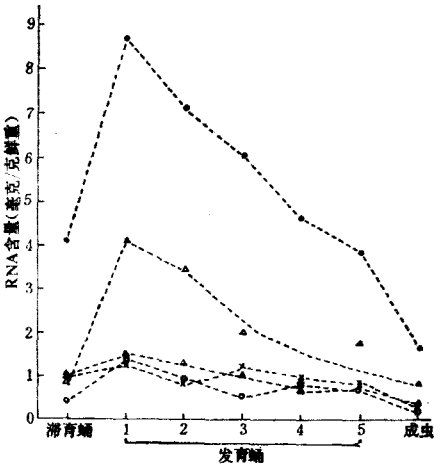


图 3 柞蚕不同发育期卵巢亚细胞组分中 RNA 的含量(按组织鲜重计算)

●---●匀浆 ▲---▲细胞核 ○---○线粒体
△---△微粒体 ×---×105,000g上清

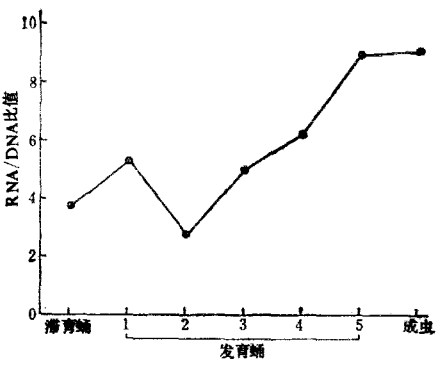


图 4 柞蚕卵巢 RNA/DNA 比值的变化

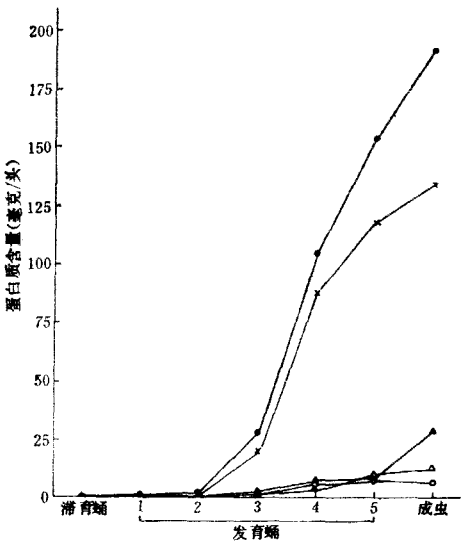


图 5 柞蚕不同发育期卵巢亚细胞组分中蛋白质的含量(按头计算)

●——●匀浆 ▲——▲细胞核
○——○线粒体 △——△微粒体
×——×105,000g上清

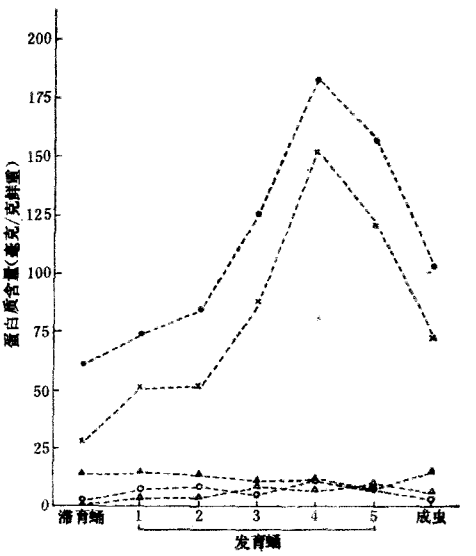


图 6 柞蚕不同发育期卵巢亚细胞组分中蛋白质的含量(按组织鲜重计算)

●---●匀浆 ▲---▲细胞核
○---○线粒体 △---△微粒体
×---×105,000g 上清

二、卵巢 105,000g 上清组分中蛋白质电泳分析

1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳见图 7。从图 7 可以看出，不同时期的卵巢上清组分中蛋白质的区带数目和染色程度都有很大差别。其中 A 带是蛹期共有而成虫期所没有的一条区带，它在卵巢中的功能还不清楚。B 带是各发育时期共有而唯独滞育期没有的区带，且随着卵巢发育而染色变深，经过分析和比较，初步认为它可能是卵黄蛋白带。C 带虽为各期

共有，但浓度变化趋势与B带相同，并从发育4期开始与B带合并在一起，因此，认为它可能也与卵巢的发育有一定关系。

2. SDS-电泳见图8，是在含有0.1% SDS 的5% 分离胶上进行电泳的 HMW 标准蛋白质和卵巢 105,000g 上清组分的蛋白质电泳图谱。图中表明，卵巢上清组分中的蛋白质亚基区带数目和着色程度随不同发育时期而变化。通过两种电泳结果的比较，初步认为 S_2 带可能相当于上述的 B 带解离后的产物。因为 S_2 带的着色变化与 B 带类似，并且只存在于发育时期的卵巢中，所以认为它可能是卵黄蛋白的亚基区带之一，分子量大约是 200,000 道尔顿。S_5 带随着卵巢的发育而变浅，在成虫期消失，与上述的A带有些相似，但由于解离之后分子量明显变小，大约是 80,000 道尔顿。其它区带浓度较低，不作为主要区带报告。

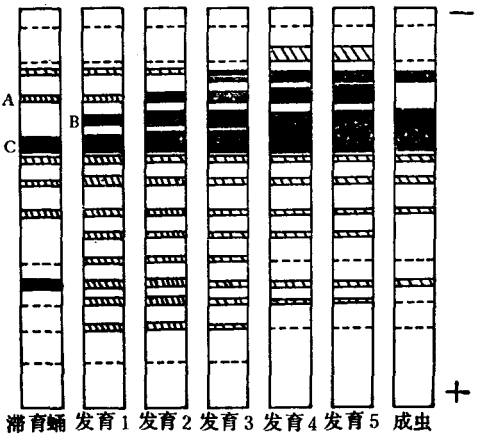


图7　柞蚕卵巢 105,000g 上清蛋白质电泳图谱

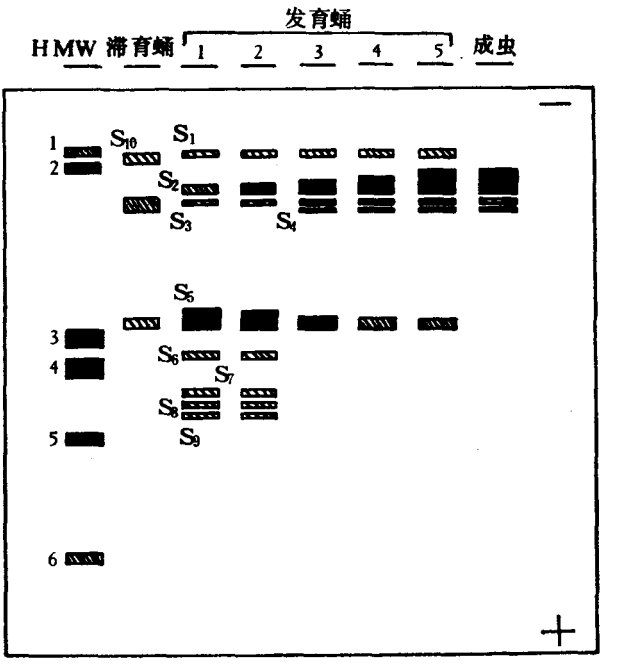


图8　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
HMW 高分子量标准蛋白质亚基
1.甲状腺球蛋白　2.铁蛋白半单位　3.白蛋白
4.过氧化氢酶　5.乳酸脱氢酶　6.铁蛋白小亚基

HMW 标准蛋白系统在 SDS-电泳上可鉴别出六条亚基区带，其分子量标准曲线见图9。

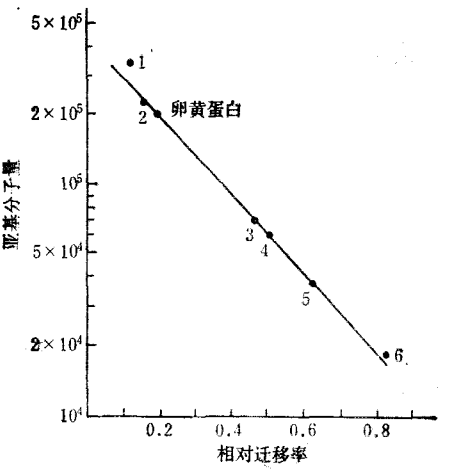


图 9 HMW 分子量标准曲线

1. 甲状腺球蛋白(33万) 2. 铁蛋白半单位(22万)
3. 白蛋白(6.7万) 4. 过氧化氢酶(6万)
5. 乳酸脱氢酶(3.6万) 6. 铁蛋白小亚基(1.85万)

讨 论

1. 核酸和蛋白质含量的变化与卵巢内部细胞和外部组织之间的关系

上述实验结果表明,在柞蚕卵巢发育过程中,核酸和蛋白质都发生了明显的变化。我们认为,造成卵巢中核酸和蛋白质含量变化的根本原因,是由于卵巢内部各种细胞的分裂、分化、生长、发育以及各自功能的不同所致,蛋白质含量的变化还与卵巢外部组织有关。柞蚕卵巢管属于多滋式卵巢管,其中包含三种功能细胞,即卵细胞、营养细胞和滤泡细胞。它们的数目和功能各不相同,并随着卵巢的发育而变化。在滞育期,柞蚕卵巢中各种细胞都停留在刚刚分化的原始状态,细胞不分裂;生长和发育也基本停止。因此,细胞内 DNA 的复制、RNA 的转录和蛋白质的合成速率很低,这是滞育期卵巢中核酸和蛋白质含量低的根本原因。

在卵巢发育的早期(发育 1 期和 2 期)和中期(发育 3 期和 4 期),DNA、RNA 和蛋白质含量都随着卵巢的发育不断增长;在发育后期(发育 5 期和成虫期),核酸含量有所下降,蛋白质含量继续增长,在成虫期达到最高水平。这可能是因为在卵巢刚开始发育时,卵巢管中逐渐有卵细胞、营养细胞和滤泡细胞分裂和分化出来。卵管末端逐渐有卵室形成,每个卵室中含有一个分化出来的卵母细胞、七个营养细胞和包围在外部的许多滤泡细胞。由于这些细胞的分裂增殖,特别是滤泡细胞的有丝分裂,使得卵巢发育的早期细胞核中 DNA 含量开始增长。正是由于细胞核中 DNA 的复制,必然转录出大量的 RNA 分子并分泌到细胞质中,从而指导蛋白质的生物合成。因此,细胞核和微粒体组分中 RNA 含量以及胞液中蛋白质含量都在逐渐增加。但是,由于这一时期的卵巢内部总的细胞数目还不多,所以各种含量增长不快。在发育中期,细胞有丝分裂的结果使得各种细胞的数目不断增多,尤其是滤泡细胞分裂旺盛。这时的卵母细胞一方面不断地从营养细胞获得核酸和蛋白质等营养物质;另一方面通过滤泡细胞从血淋巴中摄取大量的卵黄蛋白,这些

蛋白质以卵黄的形式沉积下来，使卵母细胞的体积迅速增长，因而，这一时期的核酸和蛋白质含量都有迅速增加，尤以蛋白质增加最快。

在发育后期，随着卵母细胞的生长发育，大部分营养细胞完成其输送营养的功能而分解；滤泡细胞在卵黄沉积结束时开始分泌卵黄蛋白膜和卵壳，然后便逐渐退化，导致卵巢中总的细胞数目逐渐减少。因而，核酸含量下降。但是，由于卵母细胞中卵黄蛋白的大量沉积，致使蛋白质含量继续增长。我们把卵巢的发育同核酸和蛋白质含量变化之间的关系总结在图 10 中。

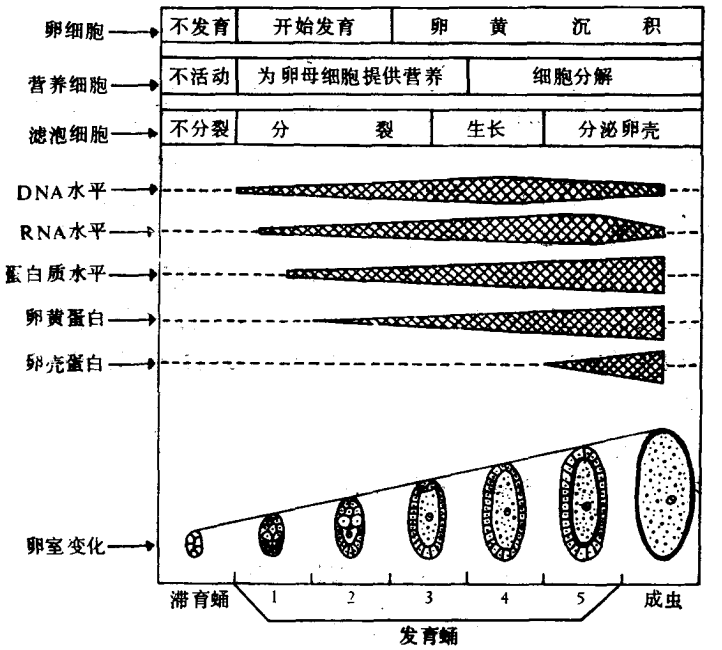


图 10　柞蚕卵巢的发育与核酸和蛋白质含量变化之间的关系

2. RNA/DNA 比值的变化与卵巢蛋白质含量变化之间的关系

一般来讲，组织中 RNA/DNA 比值的变化反映了这种组织的细胞合成蛋白质的能力。柞蚕卵巢也是如此，其 RNA/DNA 比值的变化不仅反映出不同时期的卵巢细胞核中 DNA 复制和 RNA 转录的功能，也表明卵巢内部细胞合成蛋白质的情况。然而，却不能代表卵巢中蛋白质的全部积累情况。柞蚕卵巢发育过程中，卵巢 RNA/DNA 比值与每克卵巢组织中蛋白质的相对含量没有共同的变化趋势，这是因为卵巢作为一种特化了的雌性昆虫的生殖器官，具有其独特的蛋白质代谢的方式。卵黄蛋白是卵巢中主要的蛋白质，其主要来源是脂肪体和血淋巴。可见这种来自卵巢外部的蛋白质的合成和积累与卵巢内部 RNA/DNA 比值无直接关系。

3. 柞蚕卵巢可溶性蛋白质的电泳分析

卵巢蛋白质主要存在于 105,000g 上清组分中，说明大部分卵巢蛋白质是可溶性的。根据电泳结果推测，柞蚕卵巢可溶性蛋白质的种类较多，发育初期最明显，但此时每种蛋白质的浓度都比较低。随着卵巢的发育，虽然蛋白质的种类似乎在减少，但与卵巢发育直

接相关的蛋白质，如卵黄蛋白（B 带）等的浓度却在迅速增长。这与定量测定的结果是一致的。蛹期是幼虫组织分解和成虫组织发生的变态时期，柞蚕的卵巢正是在此期间发育成熟，并由脂肪体和血淋巴提供营养。我们认为，卵巢发育初期，其可溶性蛋白质主要由卵巢本身的细胞合成；而发育中期和后期则主要来源于血淋巴中的蛋白质。因为只有卵母细胞迅速生长的时期，才有卵黄的沉积发生(Hagedorn 等，1979)。此外，我们发现柞蚕卵巢中有一条蛹期特有的区带——A 带，它也因卵巢的发育而浓度不断增加，但在成虫期却骤然消失，并且在 SDS-电泳上被解离成分子量较小(80,000 道尔顿）的亚基片段。尽管其确切的功能尚有待于查明，但它在卵巢发育中的作用是不可忽视的。

小 结

根据现有资料，关于昆虫卵巢中核酸和蛋白质的定量研究已有一些报道，如对家蚕(Chinzei 等，1972；Kobayashi 等，1978)，果蝇 (Cummings 等，1971) 和飞蝗(夏邦颖等，1974) 等昆虫的研究，都发现了卵巢发育过程中 DNA、RNA 和蛋白质含量的明显增加。然而，柞蚕卵巢发育过程中，这些生物大分子增长的速度比前几种昆虫快得多。这可能显示了发育中的柞蚕卵巢代谢活动的一个特点，这将为柞蚕的大量繁殖提供重要的物质基础。在这方面，我们与前人工作的不同之处在于：第一，我们在测定卵巢整体中核酸和蛋白质含量的同时，也对几种亚细胞组分中的含量进行了分析；第二，我们对滞育期和不同的发育时期进行了比较，并发现了其中的明显差别；第三，对卵巢可溶性蛋白质进行了电泳分析，初步确定卵黄蛋白电泳区带的位置，其亚基之一的分子量是 200,000 道尔顿。这些基础的工作都是研究柞蚕的生殖和滞育所不可缺少的。

参 考 文 献

王高顺等 1982 柞蚕一化性品种培育的研究。蚕业科学 **8**(2):106—11。

孙重光等 1963 柞蚕暖茧温度与蛹体发育的关系。蚕业科学 **1**(3): 163—8。

夏邦颖等 1974 东亚飞蝗生殖的研究：雌蝗成虫发育过程中核酸和蛋白质的代谢与激素调节。昆虫学报 **17** (2): 148—60。

夏邦颖等 1980 家蚕后丝腺亚细胞组分中核酸和蛋白质的分布。昆虫学报 **23**(1):90—2。

莽克强等 1975 聚丙烯酰胺凝胶电泳。科学出版社。

田中義麿 1950 柞蚕の越年と環境特に日长效果。I. 日蚕杂 **19**: 358—71。II. 日蚕杂 **19**:429—46。III. 日蚕杂 **19**: 580—90。

田中義麿 1951 柞蚕の越年と環境特に日长效果。IV. 日蚕杂 **20**:1—9。V. 日蚕杂，**20**:130—8。

Chinzei, Y. et al. 1972 Nucleic acid changes in the whole body and several organs of the silkworm, *Bombyx mori*, during metamorphosis. *J. Insect Physiol.* **18**: 1683—98.

Cummings, M. R. et al. 1971 Biochemical aspects of oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **17**: 2105—18.

Hagedorn, H. H. et al. 1979 Vitellogenin and vitellin in insects. *Ann. Rev. Entomol.* **24**: 475—505.

Kobayashi, M. et al. 1978 Nucleic acid changes during pupal-adult development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Appl. Ent. Zool.* **13**: 158—69.

Pharmacia Fine Chemicals, 1978 Calibration Kits for Molecular Weight Determination Using Electrophoresis, Uppsala, Sweden.

Shibko, S. et al. 1967 A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a sub-cellular fraction.

Anal. Biochem. **19**: 514—28.

Williams, C. M. 1963 Control of diapause by the direct action of light on the insect brain. *Science. Wash.* **140**: 386.

Williams, C. M. et al. 1964 Physiology of insect diapause. XIV. An endocrine mechanism for the photoperiodic control of pupal diapause in the oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Biol. Bull. Woods Hole.* **127**: 511—25.

Williams, C. M. et al. 1965 Physiology of insect diapause. XV. The transmission of photoperiodic signals to the brain of the oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Biol. Bull. Woods Hole.* **128**: 497—507.

Williams, C. M. 1967 The present status of the brain hormone. In "Insect and Physiology" (ed by Beamant, J. W. L. et al.) p. 133—9. Oliver-Boyd. Edinburgh and London.

Williams, C. M. 1969 Photoperiod and endocrine aspects of insect diapause. *Sym. Soc. Exp. Biol.* **23**: 285—300.

THE DISTRIBUTION AND QUANTITATIVE CHANGE OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS IN THE OVARY OF THE CHINESE OAK SILKWORM *ANTHERAEA PERNYI*

YI SHU-XIA　GUO FU

(Institute of Zoology, Academia Sinica)

This paper reports the distribution and quantitative change of nucleic acids and proteins in the ovary of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*. Nuclei, heavy and light mitochondria and microsomes and 105,000 g supernatant were isolated from the homogenate of the ovary, and the contents of DNA, RNA and protein were determined in each fraction.

The results indicate that over 75% of DNA in the ovary distributes in the nucleus fraction, 20—51% of RNA is in the microsome fraction and 56—83% of protein is in the 105,000 g supernatant. The nucleic acid and protein contents in the ovary are very low during pupal diapause; they increase rapidly after the pupae resume development. DNA content reaches its peak during the fourth stage of developing pupae, increasing 61 fold when compared with that of the diapausing pupae, while RNA during the fifth stage increasing 144 fold and protein during the adult stage increasing 490 fold. The relationship between the DNA, RNA and protein contents and the division and differentiation of the ovarian cells has been discussed.

Meanwhile, the proteins in the 105,000 g supernatant fraction have been analyzed by means of polyacrylamide and SDS polyacrylamide gel electrophoreses. The molecular weight of one of the vitellin subunits has been estimated to be about 200,000 daltons.

Key words *Antheraea pernyi*—ovary—nucleic acid—protein.